



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑪ CH 672 251 A5

⑤① Int. Cl.⁴: A 61 K 31/235
A 61 K 31/335

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ PATENTSCHRIFT A5

②① Gesuchsnummer: 345/89

②② Anmeldungsdatum: 29.05.1987

②④ Patent erteilt: 15.11.1989

④⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 15.11.1989

⑦③ Inhaber:
Institut Khimii Rastitelnykh Veschestv Akademii
Nauk Uzbexkoi SSR, Tashkent (SU)

⑦② Erfinder:
Kurmukov, Anvar Gafurovich, Tashkent (SU)
Akhmedkhodzhaeva, Khafiza Saidganievna,
Tashkent (SU)
Sultanov, Makhamat Babadzhonovich, Tashkent
(SU)
Saidkhodzhaev, Ashraf Ismailovich, Tashkent
(SU)
Nikonov, Georgy Konstantinovich, Alma-Ata
(SU)
Mamatkhanov, Akhmed Umarovich, Tashkent
(SU)
Shamsutdinov, Mukhamed-Rishad I., Tashkent
(SU)
Shakirov, Talat Taibbekovich, Tashkent (SU)

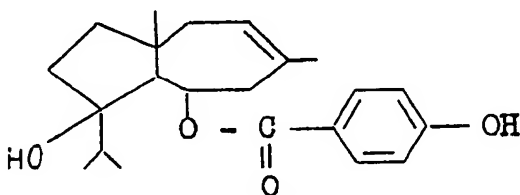
⑦④ Vertreter:
Patentanwälte Schaad, Balass & Partner, Zürich

⑧⑥ Internationale Anmeldung: PCT/SU 87/00065
(Ru)

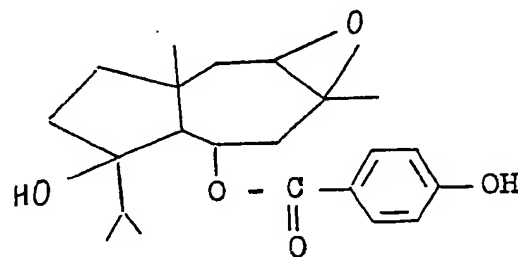
⑧⑦ Internationale Veröffentlichung: WO 88/09164
(Ru) 01.12.1988

⑤④ Arzneimittel der estrogenen Wirkung.

⑤⑦ Das Arzneimittel der estrogenen Wirkung besteht aus
dem Gemisch der Wirkstoffe 4-Hydroxy-6-(4'-oxy-
benzoyloxy)-dauk-8,9-en folgender Formel



und 4-Hydroxy-6-(4'-oxybenzoyloxy)-8,9-epoxydaukan
folgender Formel

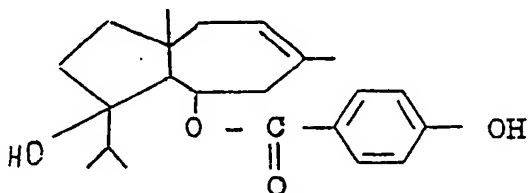


und einem pharmazeutischen Träger.

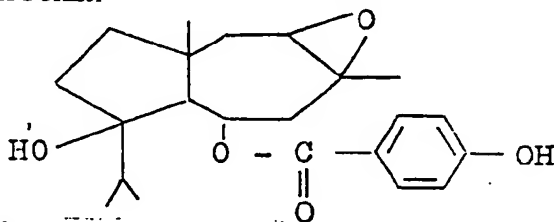
Es wird in der gynäkologischen Praxis zur Behand-
lung der Erkrankungen verwendet, die mit der Insuffizienz
der Eierstockfunktion verbunden sind.

PATENTANSPRÜCHE

1. Arzneimittel der estrogenen Wirkung, das den Wirkstoff und einen pharmazeutischen Träger vorsieht, dadurch gekennzeichnet, dass es als Wirkstoff das Gemisch aus 4-Hydroxy-6-(4'-oxybenzoyloxy)-dauk-8,9-en folgender Formel



und 4-Hydroxy-6-(4'-oxybenzoyloxy)-8,9-epoxydaukan folgender Formel



enthält.

2. Arzneimittel nach Anspruch 1 in Form von Tabletten, dadurch gekennzeichnet, dass es den Wirkstoff in einer Menge von 0,005 g pro eine Tablette enthält.

3. Arzneimittel nach Anspruch 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, dass es als pharmazeutischen Träger den Füllstoff, Stärke oder Zuckerpuder, enthält.

BESCHREIBUNG

Technisches Gebiet

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf das Gebiet der Medizin und betrifft ein neues Arzneimittel der estrogenen Wirkung

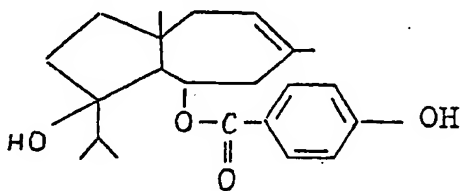
Stand der Technik

Verschiedene Arzneimittel estrogenen Wirkung sind weit bekannt und finden Verwendung beispielsweise Estron, synthetische Estrogene, solche wie Meso-3,4-di-(para-oxyphenyl)-hexan (Hyxöestrolum) oder trans-3,4-Di-(para-oxyphenyl)-hexen-3-(Diethylstilbestrolum) und andere.

Eine umfassende Verwendung synthetischer Estrogene in den letzten Jahren gestattete, eine Reihe von deren ersten Nebenwirkungen an den Tag zu legen. Die genannten Arzneimittel rufen genetische Störungen und Unfruchtbarkeit bei der Nachkommenschaft hervor.

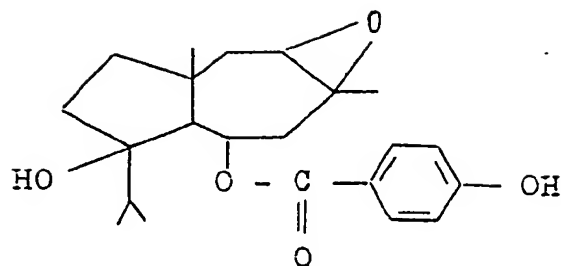
Im Zusammenhang damit wird zur Zeit in vielen Ländern die industrielle Herstellung synthetischer Estrogene reduziert und es wird eine intensive Forschung nach deren natürlichen Ersatzmitteln durchgeführt.

In der Literatur sind die Verbindungen 4-Hydroxy-6-(4'-oxybenzoyloxy)-dauk-8,9-en folgender Formel



und 4-Hydroxy-6-(4'-oxybenzoyloxy)-8,9-epoxydaukan folgender Formel

2

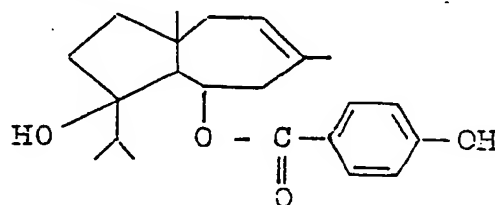


beschrieben [Chemie der Naturverbindungen (Khimiya prirodnikh soedinenii), Nr. 2, 1974, Verlag Fan der Usbekischen SSR, S. 166—170; Phytochemistry, 24, No. 3, 1985, B.M. Fraga and other «Carotane sesquiterpenes from Fetula Lancerottensis», p. 501—504]. Jedoch ist mögliches Anwendungsgebiet dafür unbekannt.

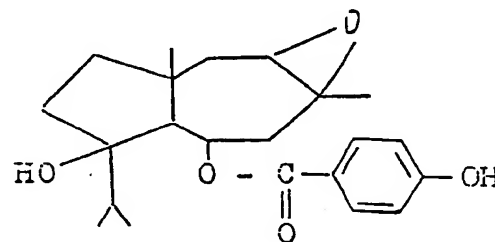
Darstellung der Erfindung

Das vorgeschlagene Arzneimittel ist neu und wurde in der Fachliteratur nicht beschrieben. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein neues Arzneimittel der estrogenen Wirkung zu entwickeln, das eine hohe Wirksamkeit, eine niedrige Toxizität besitzt und keine Nebenwirkungen hervorruft.

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, dass das vorgeschlagene Arzneimittel, das den Wirkstoff und einen pharmazeutischen Träger vorsieht, erfindungsgemäss als Wirkstoff ein Gemisch aus 4-Hydroxy-6-(4'-oxybenzoyloxy)-dauk-8,9-en folgender Formel



und 4-Hydroxy-6-(4'-oxybenzoyloxy)-8,9-epoxydaukan folgender Formel



enthält.

Das erfindungsgemässe Arzneimittel kann in verschiedenen pharmazeutischen Zubereitungen Verwendung finden. Vorzugsweise wird das erfindungsgemässe Arzneimittel in Form von Tabletten verwendet. Erfindungsgemäss enthält das erfindungsgemässe Arzneimittel in Form von Tabletten den Wirkstoff in einer Menge von 0,005 g pro eine Tablette. Als pharmazeutischen Träger enthält es vorzugsweise Stärke oder Zuckerpuder. Der Wirkstoff des erfindungsgemässen Arzneimittels stellt ein Gemisch aus den der Struktur nach nahen Estern der Sesquiterpenalkohole mit para-Hydroxybenzoesäure dar. Die genannten Verbindungen sind Naturstoffe, die im pflanzlichen Rohstoff verschiedener Ferularten enthalten sind, und stellen pulverartige cremefarbene Stoffe mit einem spezifischen Geruch dar, sind in Äthylalkohol schwer löslich, in Wasser unlöslich, in alkalischen Lösungen und Ölen gut löslich.

Das erfindungsgemässe Arzneimittel weist eine ausgeprägte estrogenere Wirkung auf. Bei der Einführung in den Organismus ruft es die Proliferation der Scheidenschleimhaut und die Endometrie der Gebärmutter hervor. Das angebotene Arzneimittel regt die Entwicklung der Gebärmutter und der sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale bei deren Infantilismus an, beseitigt allgemeine wegen der Insuffizienz der Funktion der Geschlechtsdrüsen entstehende Störungen. Das erfindungsgemässe Arzneimittel aktiviert die Synthese und Sekretion des Luteinisierungshormons und des Follikelreifungshormons in der Hypophyse und regt den Ovulationsprozess an.

Bei der Einführung zu den früheren Schwangerschaftszeiten übt das Arzneimittel einen kontrazeptiven Effekt aus. Das erfindungsgemässe Arzneimittel wird aus dem Magendarmkanal bei der peroralen Anwendung gut resorbiert, besitzt keine Reizwirkung, ist wenig toxisch, besitzt keine teratogenen und kanzerogenen Eigenschaften. Das erfindungsgemässe Arzneimittel kann beim Geschlechtsinfantilismus und Dysgenese der Gonaden, bei der primären und sekundären Amenorrhoe, bei der durch die Anovulation bedingten Unfruchtbarkeit, bei der dysfunktionellen Gebärmutterblutung zwecks Hämostase, bei der verlängerten Schwangerschaft zur Vorbereitung des Organismus zur Entbindung, beim Erguss der Fruchtwässer vor der Entbindung sowie zur Hemmung der Laktation bei den Frauen nach der Schwangerschaftsunterbrechung im zweiten und dritten Trimester verwendet werden.

Bester Weg zur Ausführung der Erfindung
Das erfindungsgemässe Arzneimittel wurde im Tierversuch und in der Klinik an Menschen geprüft.

Die estrogenere Wirkung des vorgeschlagenen Arzneimittels wurde an geschlechtsunreifen weiblichen Ratten von 30 bis 40 g Körpermasse untersucht. Das angebotene Arzneimittel ruft in Dosen von 0,01 bis 1 mg/kg Estrus hervor und vergrössert mit einer hohen Zuverlässigkeit die Masse der Gebärmutter bei den Ratten um 289 bis 541% (mit der Flüssigkeit) und um 234 bis 303% (ohne Flüssigkeit). In Übereinstimmung mit den Dosen wurde die Vergrösserung der Eierstöcke um 4,1 bis 13,1% verzeichnet. ED_{2k} (die Dosis, die den Effekt hervorruft, welcher der verdoppelten Grösse der Masse der Kontrolltiere gleich ist) für das erfindungsgemässe Arzneimittel beträgt 0,364 mg/kg, für Diethylstilbestrolum unter gleichen Versuchsbedingungen 0,330 mg/kg.

Die estrogenere Wirkung des angebotenen Arzneimittels wurde auch in den Versuchen an geschlechtsunreifen Mäusen nachgewiesen. Dabei wurde die Vergrösserung der Masse der Gebärmutter und proliferative Veränderungen darin festgestellt.

Die estrogenere Wirksamkeit des erfindungsgemässen Arzneimittels wurde auch an kastrierten Ratten und Mäusen untersucht. Die Versuche wurden an Tieren angestellt, bei welchen innerhalb von 3 Wochen nach der Ovarioektomie keine zyklischen Veränderungen in den vaginalen Abstrichen nachgewiesen wurden. Die Untersuchungsergebnisse sind in der Tabelle 1 angeführt.

30

Tabelle 1
Estrogene Wirksamkeit des erfindungsgemässen Arzneimittels an geschlechtsunreifen und kastrierten Mäusen

Lfd. Nr.	Arzneimittel	Dosis mg/kg	Vergrösserung der Masse bei geschlechtsunreifen Mäusen				
			der Gebärmutter in % zur Kontrolle	P ≥	der Eierstöcke in % zur Kontrolle	P ≥	Prozentsatz der kastrierten Mäuse mit Estrus
1	2	3	4	5	6	7	8
1.	Das erfindungsgemässe Arzneimittel	10,0	95	<0,001	8,7	0,25	100
2.	„	1,0	64	<0,001	9,7	<0,02	100
3.	„	0,1	28	<0,05	3,7	>0,5	50
4.	„	0,05	—	—	—	—	20
5.	„	0,01	—	—	—	—	10
6.	„	0,005	—	—	—	—	0

55

Das erfindungsgemässe Arzneimittel rief in einer Dosis von 0,05 mg/kg Estrus bei zwei Versuchsmäusen von 10, in einer Dosis von 0,1 mg/kg bei 5, und in einer Dosis von 1 mg/kg bei allen Versuchstieren hervor.

In den Versuchen an kastrierten Ratten war die estrogenere Wirkung des erfindungsgemässen Arzneimittels deutlicher ausgeprägt. Der estrogenere Effekt des Arzneimittels wurde in einer Dosis von 0,001 mg/kg nachgewiesen. ED₅₀

(die effektive Dosis bei 50% der Tiere) für das erfindungsgemässe Arzneimittel beträgt 0,053 mg/kg. Für Diethylstilbestrolum ist ED₅₀ unter gleichen Bedingungen 0,042 mg/kg gleich.

Das erfindungsgemässe Arzneimittel verletzt in Dosen von 0,1 und 1 mg/kg den Geschlechtszyklus bei Ratten, indem es den Zyklus auf Kosten der Estrusphase verlängert. Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2
Einfluss des erfindungsgemässen Arzneimittels auf den Geschlechtszyklus bei Ratten

Lfd. Nr. 1	Arzneimittel 2	Dosis mg/kg 3	Dauer in Tagen des Geschlechts- zyklus 4	des Estrus 5	des Ruhe- standes 6
1.	Kontrolle	–	6,0 ± 0,03	1,2 ± 0,00	2,34 ± 0,06
2.	Das erfindungsgemässe Arzneimittel	0,1	7,75 ± 0,25	3,28 ± 0,28	1,21 ± 0,24
3.	P ≥		< 0,001	< 0,001	< 0,02
4.	Kontrolle	–	6,3 ± 0,2	1,18 ± 0,18	2,34 ± 0,06
5.	Das erfindungsgemässe Arzneimittel	1,0	7,85 ± 0,38	3,23 ± 0,25	2,27 ± 0,27
6.	P ≥		< 0,02	< 0,002	> 0,5

Das erfindungsgemässe Arzneimittel stimuliert in Dosen von 0,1 und 1 mg/kg innerhalb von 5 Tagen das Entstehen von Estrus. So wurden in der Gruppe der Tiere, die das Arzneimittel 2 bis 5 Tage nach dem Unterbringen der Männchen im Käfig erhielten, bei 80% der Ratten in den vaginalen Abstrichen Spermatozoen nachgewiesen. In der Kontrollgruppe dauerte die Befruchtungszeit 7 bis 8 Tage. Beim Unterbringen der Versuchsratten am 19. Schwangerschaftstag wurde festgestellt, dass sich die befruchteten Tiere schwanger erwiesen. Alle Früchte waren lebendig, normal entwickelt. Das vor der Befruchtung eingeführte erfindungsgemässe Arzneimittel ruft keine Störung der Fruchtbarkeit hervor, beschleunigt die Zeit der Befruchtung und das Auftreten der Schwangerschaft.

Bei den Ratten, die 1 mg/kg erfindungsgemässes Arzneimittel erhielten, waren am 1. bis 12. Tag der Schwangerschaft in der Höhle der Gebärmutterhörner nur die Implantationsstellen ohne Früchte vorhanden, in den Eierstöcken waren gelbe Körper vorhanden.

Diese Angaben gestatten zu schliessen, dass die Embryonen der Ratten eine hohe Empfindlichkeit gegenüber dem erfindungsgemässen Arzneimittel besitzen, besonders an den ersten Schwangerschaftstagen. Bei der Einführung des erfindungsgemässen Arzneimittels vom 8. bis zum 16. Schwangerschaftstag wurde bei den Ratten schon am 3. bis 5. Tag innerhalb von 3 bis 5 Tagen bluthaltiges Abgesondertes nachgewiesen. Beim Sezieren der Tiere wurde festgestellt, dass von 13 befruchteten Tieren 11 schwanger waren. Bei 4 Ratten wurden keine Früchte in der Höhle der Gebärmutterhörner nachgewiesen, es wurden die Implantationsstellen in Form von kleinen Erbsen verzeichnet. Bei 4 anderen Ratten waren die Reste der rückbildenden Früchte, der Placenta

und einzelne Blutklumpen vorhanden. Bei 2 Ratten wurden lebendige, in der Entwicklung zurückgebliebene Früchte nachgewiesen, in der Rückengegend einzelner Früchte sind Blutungen vorhanden. Die Fruchtblase ist mit der serösen Flüssigkeit gefüllt. Bei einer Ratte befinden sich 3 lebendige Früchte in einem Gebärmutterhorn, im anderen Horn gibt es nur Implantationsstellen. In den Eierstöcken sind aus-
25 prägte gelbe Körper vorhanden.

In der Kontrollgruppe aus 22 Ratten erwiesen sich 20 Ratten schwanger, in der Höhle der Gebärmutterhörner wurden normal entwickelte Früchte nachgewiesen. Die Zahl der Früchte und der Implantationsstellen entsprach der Zahl
30 der gelben Körper.

Es wurde festgestellt, dass die einmalige Einführung des erfindungsgemässen Arzneimittels in subtoxischen und toxischen Dosen (2000 mg/kg) am Ende der Schwangerschaft die Entwicklung der Frucht und den Verlauf der Schwanger-
35 schaft nicht beeinflusst.

Es wurde der Einfluss des erfindungsgemässen Arzneimittels auf die Anreicherung des Eiweissstoffes in den Organen der Ratten untersucht.

Der Einfluss des erfindungsgemässen Arzneimittels auf
40 den Eiweissstoffwechsel in den Organen und im Skelettmuskel wurde an geschlechtsunreifen und kastrierten Ratten untersucht. Das erfindungsgemässe Arzneimittel wurde in einer Dosis von 1 mg/kg innerhalb von 3 Tagen eingeführt. Wie aus den Versuchsergebnissen zu ersehen ist, rief das erfin-
45 dungsgemässe Arzneimittel in einer Dosis von 1 mg/kg in den Versuchen an geschlechtsunreifen und kastrierten Ratten ebenso wie Hexoestrolum die Erhöhung des Gesamteiweisses in der Gebärmutter und in der Leber der Tiere hervor. Die Untersuchungsergebnisse sind in Tabellen 3 und 4
50 angeführt.

Tabelle 3
Einfluss des erfindungsgemässen Arzneimittels auf die Anreicherung des Eiweisses in den Organen der kastrierten Ratten

Lfd. Nr. 1	Arzneimittel 2	Eiweiss im Organ. % 3	Eiweiss. mg 4	Organ 5
1.	Kontrolle (destilliertes Wasser)	9,2 ± 0,48 17,2 ± 0,39 17,5 ± 0,25	3,8 ± 0,22 1008,0 ± 35,6 35,7 ± 1,6	Gebärmutter Leber Der vordere Schien- beinmuskel
2.	Das erfindungsgemässe Arz- neimittel 1 mg/kg	10,2 ± 0,9 17,6 ± 0,43 17,3 ± 0,18	18,8 ± 1,52 1319,0 ± 55,2 35,2 ± 1,1	Gebärmutter Leber Der vordere Schien- beinmuskel

Tabelle 3 (Fortsetzung)
Einfluss des erfindungsgemässen Arzneimittels auf die Anreicherung des Eiweisses in den Organen der kastrierten Ratten

Lfd. Nr. 1	Arzneimittel 2	Eiweiss im Organ, % 3	Eiweiss, mg 4	Organ 5
3.	Hexoestrolum 1 mg/kg	10,4 ± 0,85 17,6 ± 0,39 17,5 ± 0,32	14,5 ± 1,12 1101,0 ± 44,1 35,7 ± 1,5	Gebärmutter Leber Der vordere Schienbeinmuskel

Der Charakter und der Einflussgrad des erfindungsgemässen Arzneimittels auf den Stoffwechsel hing von dem hormonalen Status der Tiere ab. Bei der Einführung den geschlechtsreifen — ovarioektomierten Tieren übte das erfindungsgemässe Arzneimittel einen deutlicheren Effekt aus, als bei der Einführung den geschlechtsunreifen Tieren.

Tabelle 4
Einfluss des erfindungsgemässen Arzneimittels auf die Anreicherung des Eiweisses in der Gebärmutter der geschlechtsunreifen Ratten

Lfd. Nr.	Arzneimittel	Eiweiss im Organ, mg	Eiweiss mg
1.	Kontrolle Das erfindungsgemässe Arzneimittel 1 mg/kg	14,7 ± 1,30	4,3 ± 0,32
2.	Kontrolle	13,2 ± 0,83	11,2 ± 0,85
3.	Hexoestrolum 1 mg/kg	14,7 ± 1,30	4,3 ± 0,32
		13,1 ± 1,20	10,6 ± 0,65

Unter Berücksichtigung der Saisonveränderungen des endokrinen Systems wurden von uns die Untersuchungen der Abhängigkeit des pharmakologischen Effekts des erfindungsgemässen Arzneimittels von der Jahreszeit durchgeführt. Die Versuche wurden im Vergleich zum bekannten synthetischen Estrogen — Hexoestrolum vorgenommen. Die Versuche wurden an 460 geschlechtsunreifen weiblichen Ratten im Alter von 30 Tagen von 30 bis 35 g Körpermasse durchgeführt. Die Arzneimittel wurden in einer Dosis von 1 mg/kg einmal täglich innerhalb von drei Tagen eingeführt. Die Untersuchungen wurden in der Mitte jedes Monats unternommen. Der estrogene Effekt des erfindungsgemässen Arzneimittels und des Hexoestrolums wurde nach der Vergrößerung der Gebärmuttermasse und des Gesamtgehalts am Eiweiss darin beurteilt, weil für die Wirkung der Estrogene eine frühere und signifikante Vergrößerung dieser Komponente im gegebenen Organ kennzeichnend ist.

Wie aus den Versuchsergebnissen ersichtlich ist, rief das erfindungsgemässe Arzneimittel in der verwendeten Dosis die Vergrößerung der Gebärmuttermasse und des Gesamtgehalts am Eiweiss darin das ganze Jahr hindurch hervor, d.h. wies einen deutlichen estrogenen Effekt in Laufe des ganzen Jahres auf. Jedoch war die Ausprägtheit des estrogenen Effekts zu verschiedenen Jahreszeiten verschieden. Im Wintermonat war sie am geringsten, in den Herbstmonaten — am höchsten. Es ist die indirekt proportionale Abhängigkeit zwischen der Grösse der Gebärmuttermasse und dem Gehalt am Eiweiss darin und der Ausprägtheit der Wirkung beider Arzneimittel gut zu ersehen. Im August, zum Beispiel, wo die Gebärmuttermasse der Kontrolltiere durchschnittlich 28,1 mg betrug, erhöhten Hexoestrolum und das erfindungsgemässe Arzneimittel die Masse auf 86,5 bzw.

96,6 mg. Im Oktober, wo die Masse der Gebärmutter der Kontrollratten auf 20 mg sank, erhöhten diese das erfindungsgemässe Arzneimittel und Hexoestrolum umgekehrt schon auf 85,2 bzw. 92,5 mg.

Also werden die Akrophasen der Saisonveränderungen des Effekts im Februar (der Effekt ist am geringsten) und im November (der Effekt ist am höchsten) verzeichnet.

Vom März bis zum September war die Wirkungsstärke von Hexoestrolum und dem erfindungsgemässen Arzneimittel auf dem gleichen Niveau, weiter geht das Anwachsen des Effekts des angebotenen Arzneimittels vom November bis zum Februar an, dann wird eine allmähliche Herabsetzung des Effekts festgestellt.

Es wurde der Einfluss des erfindungsgemässen Arzneimittels auf den Gehalt am Luteinisierungs- und Follikelreifungshormon im Blutplasma und in der Hypophyse der Versuchstiere untersucht.

Es wurde der Einfluss des erfindungsgemässen Arzneimittels in zwei Dosen — 1,0 und 10 mg/kg (bei der peroralen Einführung) auf den Gehalt am Luteinisierungs- und Follikelreifungshormon im Blut und in der Hypophyse bei weiblichen Ratten während der Schlüsselstadien des Estralzyklus der Tiere, und zwar im Diestrus-2 und im Proestrus untersucht. Die Versuche wurden an 240 weiblichen Ratten durchgeführt. In der ersten Untersuchungsreihe wurde das erfindungsgemäss vorgeschlagene Arzneimittel in der früheren Periode der Schlüsselstadien, d.h. um 09.00 Uhr morgens der Stadien des Diestrus-2 und Proestrus in einer Dosis von 10 mg/kg unter Beurteilung der Veränderungen am Gehalt des Luteinisierungs- und des Follikelreifungshormons in den früheren Stufen nach der Einführung des Arzneimittels, u.z. nach 3, 6 und 24 Stunden eingeführt. In der zweiten Untersuchungsreihe wurde das erfindungsgemässe Arzneimittel nach 18, 24 und 42 Stunden unter der 6-stündigen Verschiebung im Vergleich zur Zeit dessen Einführung näher zur Periode der Entwicklung der präovulatorischen Welle des Luteinisierungshormons im Blut eingeführt. Die zweite Untersuchungsreihe war im Vergleich zur ersten erweitert, da zwei Dosen des erfindungsgemässen Arzneimittels 1,0 und 10 mg/kg ausgenutzt wurden und die Untersuchung des Gehalts an zwei Gonadotropine — am Luteinisierungs- und Follikelreifungshormon im Blut und in der Hypophyse mit Hilfe der Radioimmunologischen Methode durchgeführt wurde.

Die in der ersten Serie erhaltenen Ergebnisse haben ergeben, dass die Einführung des erfindungsgemässen Arzneimittels um 09.00 Uhr morgens in der Stufe des Diestrus-2 die Erhöhung des Blutgehalts am Luteinisierungshormon hervorruft, der einen zuverlässigen Wert 3 und 24 Stunden nach der Einführung erreicht. Innerhalb dieses Zeitraums betrug der Blutgehalt am Luteinisierungshormon 83,7 ± 4,6 ng/ml und 136,2 ± 14,6 ng/ml, was zuverlässig höher im Vergleich zu den bei den Kontrolltieren erhaltenen Werten war (61,5 ± 8,7 ng/ml bzw. 42,0 ± 10,1 ng/ml).

Dadurch verstärkte die Einführung des erfindungsgemässen Arzneimittels in der früheren Stufe der Schlüsselperiode des Estralzyklus die Sekretion des Luteinisierungshormons aus der Hypophyse. Daneben zeigte die durchgeführte Einschätzung des Hormonspiegels in der Hypophyse bei den Tieren der gegebenen Serie eine zuverlässige Erhöhung des Spiegels im Drüsengewebe. Das alles zeugt davon, dass das erfindungsgemässe Arzneimittel neben der Aktivierung der

Sekretion des Luteinisierungshormons aus der Hypophyse dessen Synthese wesentlich anregt. Es muss hervorgehoben werden, dass diese Erscheinungen nur bei der Einführung des erfindungsgemässen Arzneimittels zu den Morgenstunden des Diestrus-2-Stadiums beobachtet werden, weil es bei der Einführung um 09.00 Uhr morgens des Proestrusstadiums keine ähnlichen Veränderungen hervorruft. Die Untersuchungsergebnisse sind in Tabellen 5 und 6 angeführt.

Tabelle 5

Charakter der Veränderung des Blutgehalts am Luteinisierungshormon (ng/ml) bei der Einführung des erfindungsgemässen Arzneimittels den zyklisierenden weiblichen Ratten um 09.00 Uhr morgens des Diestrus-2- und Proestrus-Stadiums in einer Dosis von 10 mg/kg bei der Materialentnahme in verhältnismässig kürzeren Zeitabschnitten nach der Einführung des Arzneimittels (3, 6 und 24 Stunden)

Lfd. Nr.	Zeitabschnitt nach der Einführung	M ± m	Zeit der Einführung Kontrolle	Einführung um 09.00 Uhr morgens des Diestrus-2-Stadiums	Kontrolle	Einführung um 09.00 Uhr morgens des Proestrus-Stadiums
1	2	3	4	5	6	7
1.	3 Stunden	M ± m P ≥	61,5 ± 8,7	83,7 ± 4,6 < 0,05	183,0 ± 17,7	127,5 ± 14,9 < 0,05
2.	6 Stunden	M ± m P ≥	89,7 ± 10,1	93,0 ± 13,9 > 0,05	165,0 ± 26,6	122,1 ± 16,1 > 0,05
3.	24 Stunden	M ± m P ≥	42,0 ± 10,1	136,2 ± 14,7 < 0,001	57,1 ± 4,4	48,6 ± 9,2 > 0,05

Tabelle 6

Charakter der Veränderung des Hypophysengehalts am Luteinisierungshormon (ng/ml) bei der Einführung des erfindungsgemässen Arzneimittels den zyklischen weiblichen Ratten um 09.00 Uhr morgens des Diestrus-2- und Proestrus-Stadiums in einer Dosis von 10 mg/kg bei der Materialentnahme in verhältnismässig kürzeren Zeitabschnitten nach der Einführung des Arzneimittels (3, 6 und 24 Stunden)

Lfd. Nr.	Zeitabschnitt nach der Einführung	M ± m	Zeit der Einführung Kontrolle	Einführung um 09.00 Uhr morgens des Diestrus-2-Stadiums	Kontrolle	Einführung um 09.00 Uhr morgens des Proestrus-Stadiums
1	2	3	4	5	6	7
1.	3 Stunden	M ± m P ≥	1270,6 ± 259,5	2058,2 ± 209,0 < 0,05	1197,5 ± 397,5	2178,8 ± 294,9 < 0,05
2.	6 Stunden	M ± m P ≥	1400,8 ± 78,8	2680,0 ± 433,9 < 0,05	1625,0 ± 319,7	2450,0 ± 415,1 < 0,05
3.	24 Stunden	M ± m P ≥	2330,0 ± 473,6	509,9 ± 37,5 < 0,001	569,8 ± 37,7	634,8 ± 98,3 < 0,05

Die Untersuchung der Frage der Annäherung der Zeit der Einführung des erfindungsgemässen Arzneimittels zur Zeit der Entwicklung der präovulatorischen Welle des Luteinisierungshormons zeigte, dass das erfindungsgemässe Arzneimittel eine hemmende Wirkung auf den Sekretionsprozess unter Äusserung der Merkmale der Anreicherung des Hormons in der Hypophyse ausübt.

Somit zeigten die Versuche an Ratten, dass die Dosis des erfindungsgemässen Arzneimittels von 10 mg/kg in den früheren Stufen nach dessen Einführung die Synthese von Gonadotropin in der Hypophyse verstärkt und seine Sekretion anregt. Besonders deutlich ist es bei der Einführung des erfindungsgemässen Arzneimittels am Morgen im Diestrus-2, d.h. lange vor der präovulatorischen Welle des Luteinisierungshormons im Blut. Die Annäherung der Zeit der Einführung zum Schlüsselmoment des Estralzyklus hemmt den Sekretionsprozess, und die Einführung nach der Welle der

endogenen Estrogene beeinflusst das Niveau des Luteinisierungshormons 18 und 24 Stunden nach der Einführung praktisch nicht, erhöht es jedoch nach 42 Stunden.

Das erfindungsgemäss vorgeschlagene Arzneimittel erhöhte in einer Dosis von 1 mg/kg bei dessen Einführung um 15.00 Uhr des Diestrus-2-Stadiums die Sekretion von Gonadotropin 18 Stunden nach der Einführung (200,9 ± 16,9 ng/ml) und schwächte sie 42 Stunden nach der Einführung ab (20,9 ± 3,2 ng/ml), ohne dabei das durchschnittliche Niveau des Luteinisierungshormons in der Hypophyse zu verändern. Die Einführung des vorgeschlagenen Arzneimittels um 15.00 Uhr des Proestrus-Stadiums, d.h. nach der kritischen Welle der Freisetzung des endogenen Estrogene, übte einen geringen Einfluss auf den Niveau des Hormons im Blut nach 24 und 42 Stunden aus, jedoch wurde seine Sekretion 18 Stunden nach der Einführung herabgesetzt (20,8 ± 2,3 ng/ml). Dabei veränderte sich das Niveau des Luteinisierungshor-

mons in der Hypophyse wesentlich nicht, ausgenommen ein Intervall von 24 Stunden nach der Einführung des erfindungsgemässen Arzneimittels im Proestrus-Stadium um 15.00 Uhr.

Die Untersuchungen zur Bestimmung des Niveaus des Follikelreifungshormons zeigten, dass das Niveau des Follikelreifungshormons im Blut unter diesen Versuchsbedingungen am häufigsten erhöht wird und gewöhnlich durch die Erhöhung dessen Gehalts in der Hypophyse begleitet wird. Am deutlichsten war der erwähnte Effekt bei der geringen Dosis des erfindungsgemässen Arzneimittels von 1 mg/kg oder einer Dosis von 10 mg/kg, aber bei der früheren Periode der Einführung ausgeprägt (Diestrus-2, um 15.00 Uhr). Somit regt das erfindungsgemässe Arzneimittel die Synthese an und aktiviert die Sekretion des Follikelreifungshormons.

Es wurde der Einfluss des erfindungsgemässen Arzneimittels auf den Progesteron- und Estradiolspiegel im Blut der zyklierenden weiblichen Ratten untersucht. Wie aus den experimentellen Angaben zu ersehen ist, setzte das erfindungsgemässe Arzneimittel bei der einmaligen Einführung in einer Dosis von 1 mg/kg den Progesteronspiegel im Blut herab. Eine höhere Dosis des erfindungsgemässen Arzneimittels von 10 mg/kg in der ersten Stufe (18 Stunden nach der Einführung) erhöhte das Niveau des Hormons, und in den nachfolgenden Stufen (nach 24 und 48 Stunden) entweder beeinflusste die Konzentration von Progesteron im Blut nicht (bei der Einführung um 15.00 Uhr des Diestrus-2-Stadiums) oder setzte diese herab (bei der Einführung um 15.00 Uhr des Proestrus-Stadiums). Indem das gemäss der Erfindung vorgeschlagene Arzneimittel den estrogenen Effekt aufweist, hemmte es bei der Einführung im Diestrus-2-Stadium viel häufiger die Sekretion der endogenen Estrogene aus den Eierstöcken.

Die erhaltenen Ergebnisse gestatten zu schliessen, dass die Effekte des erfindungsgemässen Arzneimittels, die auf dem Niveau der Gebärmutter und der Eierstöcke beobachtet werden, nicht durch endogene Estrogene bedingt sind, sondern selbständig sind.

Die Versuche haben bestätigt, dass das erfindungsgemässe Arzneimittel mit dem endogenen Estradiol für die Rezeptorenstellen in der Hypophyse konkurrieren kann und dadurch seine biologische Wirkung an den Tag legen kann.

Das erfindungsgemässe Arzneimittel wies eine niedrige akute Toxizität auf. LD₅₀ bei der peroralen Einführung bei Mäusen betrug 2220 mg/kg, bei Ratten 4700 mg/kg. In den Versuchen an Hunden und Ratten erwies sich das erfindungsgemässe Arzneimittel für den Organismus bei der dauernden I (innerhalb von 1 und 6 Monaten) Anwendung in Dosen von 0,1 mg/kg, 1,0 mg/kg und 10 mg/kg als unschädlich. Es rief keine pathologischen Veränderungen seitens des peripheren Bluts, der Harnzusammensetzung und des morphologischen Bildes des Gehirns und der inneren Organe hervor.

Wie die Versuche ergeben haben, übt das erfindungsgemässe Arzneimittel keine teratogene und kanzerogene Wirkung aus, beeinflusst den Blutgerinnungsprozess nicht.

Das erfindungsgemässe Arzneimittel wurde in den Kliniken an 468 kranken Frauen untersucht. Als Kontrollgruppen in verschiedenen Kliniken waren parallele Gruppen der kranken Frauen ausgenutzt, die mit Mikrofollin (Äthinylestradiol) oder Diethylstilbestrolum behandelt wurden. Das erfindungsgemässe Arzneimittel wurde beim Geschlechtsinfantilismus bei 12 bis 16 Jahre alten Mädchen untersucht. Vor dem Beginn der Behandlung wurde die Untersuchung aller Kranken vorgenommen, einschliesslich: Anthropome-

trie, Tests der funktionellen Diagnostik; die Bestimmung der Geschlechtsentwicklung; im Zusammenhang damit wurde der Zustand der äusseren Geschlechtsorgane eingeschätzt (die Entwicklung der kleinen Schamlippen, die Färbung und «die Saftigkeit» der weiblichen Scham Schleimhaut); Vaginoskopie, um den Zustand des Gebärmutterhalses festzustellen; das Ultraschallabtasten der Organe des Kleinbeckens; die Bestimmung des Knochenalters. Das erfindungsgemässe Arzneimittel wurde in einer Dosis von 5 bis 10 mg pro Tag in Kuren von 20 Tagen, insgesamt 1 bis 2 Kuren, verordnet.

Nach der ersten Behandlungskur wird bei den Kranken die Quellung der Milchdrüsen bis zur Stufe des Pubertäters verzeichnet. Bei der äusseren Beobachtung der Genitalien wurde «die Saftigkeit» der weiblichen Scham Schleimhaut, bei der Vaginoskopie — das Phänomen «der Pupille» (+) und das Vorliegen von schleimigen Ausscheidungen aus dem Zervikalkanal nachgewiesen. Bei einem der acht Mädchen war nach der ersten Behandlungskur (20 Tage) eine menstrualähnliche Reaktion innerhalb von 3 Tagen zu sehen. Die Kontrollgruppe ähnlicher Kranken, die mit Mikrofollin in einer Dosis von 0,05 g innerhalb von 21 Tagen mit einer 10tägigen Pause behandelt wurde, zeigte die gleiche Estrogenisierungsstufe wie die mit dem erfindungsgemässen Arzneimittel behandelte Gruppe. Jedoch rief Mikrofollin Nebenerscheinungen häufiger hervor.

Das erfindungsgemässe Arzneimittel übte eine estrogen Wirkung auf den Organismus der Kranken mit verschiedenen Formen des primären weiblichen Hypogonadismus aus, indem es den mammatropen Effekt aufwies und das Endometrium beeinflusste.

Der mammatrope Effekt äusserte sich mindestens nach 3 bis 6 Monaten der ununterbrochenen Behandlung. Bei allen Kranken wurde die gesetzmässige menstrualähnliche Reaktion beobachtet. Im Vergleich zu Mikrofollin wurde eine mildere Wirkung und praktisch das Ausbleiben der Nebenwirkung beim erfindungsgemässen Arzneimittel nachgewiesen.

Das erfindungsgemässe Arzneimittel wurde bei der Behandlung der Patientinnen mit der verzögerten Geschlechtsentwicklung verwendet, die früher mit Mikrofollin erfolglos behandelt wurden. Die Verwendung des erfindungsgemässen Arzneimittels rief die Vergrösserung der Milchdrüsen, das Auftreten der «Saftigkeit» der weiblichen Scham- und Scheidenschleimhaut, die Verschiebung des Reifungsindex nach rechts hervor. In Tabellen 7, 8, 9 werden die Angaben der durchgeführten Untersuchungen an Kranken mit der sekundären Amenorrhoe, Oligomenorrhoe, mit der primären und sekundären Unfruchtbarkeit angeführt.

Tabelle 7

Angaben der Messung der basalen Temperatur vor und nach der Behandlung mit dem erfindungsgemässen Arzneimittel

Charakter der Kurve	Anzahl der Kranken vor der Behandlung	während der Behandlung
Normaler Zweiphasenzyklus	0	42
Insuffizienz der 2. Zyklusphase	20	30
Monophasenkurve	<u>72</u>	<u>20</u>
Gesamtanzahl der Kranken	92	92

Tabelle 8
Angaben der kolpozytologischen Untersuchungen

Charakter des Zyklus	Anzahl der Kranken vor der Behandlung	während der Behandlung
Normaler Zweiphasen- zyklus	0	42
Insuffizienz der 2. Zyklusphase	16	18
Insuffizienz der 1. und 2. Phase	6	14
Anovulation	70	18
Gesamtanzahl der Kranken	92	92

Tabelle 9
Angaben der hormonalen Untersuchungen

Lfd. Nr.	Hormone Hormone	Amenorrhoe vor der Behandlung 3	während der Behandlung 4	Oligomenorrhoe vor der Behandlung 5	während der Behandlung 6	Anovulatorischer Zyklus vor der Behandlung 7	während der Behandlung 8
1.	Luteinisierungs- hormon, ng/ml	18,4 ± 5,3	9,8 ± 4,3	11,0 ± 2,6	19,1 ± 4,9	8,5 ± 2,6	11,0 ± 2,7
2.	Follikelreifungs- hormon, ng/ml	4,05 ± 0,7	3,5 ± 1,2	2,3 ± 0,9	1,5 ± 0,8	3,3 ± 0,2	4,0 ± 0,3
3.	Estradiol, ng/ml	42,4 ± 5,9	63,0 ± 14,0	82,0 ± 12,6	130,0 ± 9,5	95,3 ± 13,5	114,0 ± 13,7
4.	Progesteron, ng/ml	—	—	—	—	3,8 ± 0,9	15,6 ± 2,6

Die Behandlung der oben erwähnten 92 Kranken mit dem erfindungsgemässen Arzneimittel führte zur Wiederherstellung des ovulatorischen Zyklus bei 45,6% der Kranken, ausserdem wurde bei 20% der Kranken die Ovulation nachgewiesen, jedoch wurde die Insuffizienz der zweiten Phase und bei 15,2% der Kranken mit der Anovulation — die Insuffizienz beider Zyklusphasen verzeichnet.

Bei den an Amenorrhoe kranken Frauen (19 Patientinnen) trat in 63,1% der Fälle bei der Einnahme des erfindungsgemässen Arzneimittels eine menstrualähnliche Reaktion auf. Die Schwangerschaft trat bei der isolierten Anwendung des erfindungsgemässen Arzneimittels bei 12% der Kranken auf, die an Unfruchtbarkeit litten. Bei 42% der Kranken trat die Schwangerschaft bei der kombinierten Anwendung des erfindungsgemässen Arzneimittels in Verbindung mit Klostilbegid/1-Chlor-2-para-(2-diäthylamino-äthoxy)-phenyl-1,2-diphenyl-äthylendiozitat Choriogonin auf. Die Schwangerschaft endete mit der zeitigen Entbindung in 32% der Kranken, mit dem spontanen Abort im ersten Trimester der Schwangerschaft bei 16% der Kranken.

Bei den Kranken mit der gestörten Menstrualfunktion verschiedener Herkunft und der Endometriumphathologie übte das erfindungsgemässe Arzneimittel einen positiven Effekt aus. So führte das erfindungsgemässe Arzneimittel beim Vorliegen der anovulatorischen Blutungen bei den Frauen jüngerer Alters in einer Dosis von 1 Tablette (5 mg) 4mal pro Tag innerhalb von 2 bis 3 Monaten in Verbindung mit Geotogenen nach dem üblichen Schema zur estrogenen Hämostase. Praktisch gelang es bei allen Frauen, die Normalisation des Menstrualzyklus zu erreichen.

Bei den Kranken mit der diffusen Gebärmutterblutung führte die Einnahme von 10 Tabletten des erfindungsgemässen Arzneimittels (zu 5 mg) gewöhnlich zur Hämostase.

Den früher wegen des Stein-Leventhal-Syndroms operierten Kranken, bei welchen sich später die Hypofunktion

der Eierstöcke nach der subkutanen Transplantation der Eierstöcke entwickelte, wurde im Falle der ungenügenden Funktion des Transplantats das erfindungsgemässe Arzneimittel in einer Dosis von 2,5 bis 5 mg einmal täglich innerhalb von 12 bis 14 Tagen verordnet (die erste Zyklusphase). Das erfindungsgemässe Arzneimittel übte einen deutlichen Effekt aus: die basale Temperatur wurde diffus, es wurde «die Saftigkeit» der Scheidenschleimhaut verzeichnet, der karyopyknotische Index wurde höher, bedeutend höher wurde der Gehalt an Estrogenen im Blut und Harn. So trat die Schwangerschaft bei 21% der Frauen aus 14 behandelten Kranken auf. Die ähnliche Kontrollgruppe der Kranken hielt unter gleichen Bedingungen Mikrofolin nach dem üblichen Schema und in üblicher Dosierung. Die Analyse der erhaltenen Vergleichsangaben zeigte die gleiche Wirksamkeit des erfindungsgemässen Arzneimittels und Mikrofolins. Es wird jedoch festgestellt, dass beim angegebenen Arzneimittel eine mildere Wirkung auf die Ziel-Organen als bei Mikrofolin und besonders bei Diethylstilbestrolum nachgewiesen wird. Das erfindungsgemässe Arzneimittel wird von den Kranken gut vertragen und übt praktisch keine Nebenwirkung aus.

Anhand der Ergebnisse der klinischen Untersuchung bei der Einschätzung des Einflusses des erfindungsgemässen Arzneimittels auf verschiedene Glieder des Systems Hypophyse — Eierstöcke — Gebärmutter kann die Schlussfolgerung über dessen bevorzugte Wirkung auf das Niveau der peripheren Glieder des Reproduktionssystems und der receptorischen Organe gezogen werden. So erhöhten sich während der Behandlung mit dem erfindungsgemässen Arzneimittel (eine Behandlungskur) die Indizes der estrogenen Gesättigtseins des Organismus nach den Angaben des Tests der funktionellen Diagnostik, während sich das Niveau des Follikelreifungshormons (vor der Behandlung $7,34 \pm 1,25$ ng/ml, während der Behandlung $7,95 \pm 1,03$ ng/ml, $P > 0,5$) und des Luteinisierungshormons (bzw. $8,22 \pm 0,45$ ng/ml

und $8,06 \pm 0,81$ ng/ml, $P > 0,5$) zuverlässig nicht veränderte.

Dadurch weist das erfindungsgemäße Arzneimittel eine ausgeprägte estrogenere Wirkung aus. Besonders effektiv ist seine Verwendung bei der verzögerten Geschlechtsentwicklung. Es ist auch als Mittel des Induzierens und der Regelung des Menstrualzyklus, sowie bei der Verordnung zwecks Hämostase effektiv. Es verbessert die Regenerierung des Endometriums bei chronischer Endometritis, vermindert die Laktostase bei den Frauen nach der Unterbrechung der Schwangerschaft im 2. und 3. Trimester.

Das erfindungsgemäße Arzneimittel legt keine deutliche Nebenwirkung an den Tag, besitzt eine mildere allmählich ansteigende Wirkung, wodurch es sich von den bekannten Arzneimitteln Diethylstilbestrol und Mikrofollin vorteilhaft unterscheidet.

Das erfindungsgemäße Arzneimittel kann in verschiedenen Arzneiformen (in Tabletten, Suppositorien, Oblatenkapseln u.a.) Verwendung finden. Die Einzel- und Kurdosis werden individuell je nach der Erkrankungsform festgestellt. Die therapeutische Dosis beträgt 0,005 g, die höchste Einzeldosis 0,02 g, die höchste Tagesdosis 0,05 g. Die Behandlungskur beträgt von 15 Tagen bis 9 Monaten.

Das erfindungsgemäße Arzneimittel wird von den Kranken gut vertragen und weist keine Nebenwirkungen auf.

Das erfindungsgemäße Arzneimittel ist bei den Erkrankungen der Milchdrüsen und bei hormonalabhängigen Erkrankungen der Geschlechtsdrüsen (Gebärmutterlipom, Endometriose) kontraindiziert.

Die Arzneiformen des erfindungsgemässen Arzneimittels werden in an sich bekannter Weise hergestellt.

Der Wirkstoff des erfindungsgemässen Arzneimittels wird aus dem pflanzlichen Rohstoff von verschiedenen Ferulaarten isoliert.

Das Verfahren zur Isolierung des Wirkstoffes kann wie folgt verwirklicht werden.

Die Wurzel und der überirdische Teil der Pflanze werden zerkleinert, der Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel unterzogen, dann wird der erhaltene Extrakt verdickt und im Schwefeläther gelöst; aus der Lösung werden freie organische Säuren mit 5%iger Pottasche entfernt, aus der ätherischen Lösung werden Ester mit 1%iger Kalilauge extrahiert. Der alkalische Extrakt wird mit Schwefelsäure bis zum Erreichen eines pH-Wertes von 4 bis 5 angesäuert, nachher werden Ester aus der sauren Lösung mit Schwefeläther extrahiert, der Äther wird abgetrieben, die Estersumme wird in die Kolonne mit Silikagel eingetragen. Dann wird das Zielprodukt mit Chloroform eluiert, Chloroform wird abgetrieben und das Zielprodukt wird getrocknet.

Man erhält ein Gemisch aus 4-Hydroxy-6-(4'-oxybenzoyloxy)-8,9-epoxydauk-8,9-en und 4-Hydroxy-6-(4'-oxybenzoyloxy)-8,9-epoxydaukan, das ein gelblich-cremefarbenes pulverartiges Produkt mit dem spezifischen Geruch darstellt, in alkalischen Lösungen, Ölen löslich ist, in 95%igem Äthylalkohol schwer löslich ist, in Wasser unlöslich ist.

Gewerbliche Verwendbarkeit

Das erfindungsgemäße Arzneimittel wird in der gynäkologischen Praxis zur Behandlung der Erkrankungen verwendet, die mit der Insuffizienz der Eierstockfunktion verbunden sind, wie primäre und sekundäre Amenorrhoe, die durch die Anovulation bedingte Unfruchtbarkeit, dysfunktionelle Gebärmutterblutung, schwache Entbindungstätigkeit u.a.